29 34

A Monsieur Claude Bernard
Membre de l'Institut
hommage de l'auteur.

Ueber die quantitative Bestimmung des Kreatins in den Muskeln.

Von

Felix Nawrocki aus Warschau *).

Im Anschlusse an Professor Heidenhains **) Untersuchungen über die Beziehung der Arbeit der Muskeln zur Wärmeentwicklung und Stoffumsatz in denselben hat Dr. Basler ***) im vorigen Jahre einige Kreatinbestimmungen gereizter Muskeln im chemischen Laboratorium des Breslauer physiologischen Institutes ausgeführt. Er verglich Muskeln, welche sich in Folge elektrischer Reizung ohne Belastung häufig contrahirt hatten, mit solchen, die während der Contractionen ein Gewicht zu heben hatten, und kam zu Resultaten, die ich hier zusammenstelle.

---

*) Herr Dr. Nawrocki hat die Güte gehabt die Resultate seiner Untersuchungen über die quantitative Bestimmung des Kreatins in den Muskeln, welche auf Seite 169 dieses Jahrganges in kürzerer (für Mediciner bestimmter) Fassung bereits mitgetheilt worden, in ausführlicher (für Chemiker bestimmter) Darstellung für die Zeitschrift einzusenden. Jene Notiz war dem Centralblatte für die medicinischen Wiss. 1865. N. 27 entnommen und nur der Umstand, dass ein Extraabdruck an die Redaction gelangte, veranlasste die Bemerkung „vom Verfasser mitgetheilt." Der Herausgeber.

**) R. Heidenhain, Mechanische Leistung, Wärmeentwicklung und Stoffumsatz bei der Muskelthätigkeit. Leipzig, 1864

***) O. Basler. Quae cum labore musculorum conjunctae sint mutationes chemicae, quaeritur. Vratislaviae 1864.

Zeitsch. f. anal. Chemie,

Versuch I.	Gewicht der Muskeln in Grm.	Kreatin in Grammen.	Chlorzink-kreatinin in Grammen.	Kreatin in %.	Chlor-zink-kreatinin in %.
A. Muskeln unbelastet .	25,7	0,0380	0,0369	0,15	0,14
B. Muskeln belastet . .	25,2	0,0380	0,0451	0,15	0,17
II.					
A. Muskeln unbelastet .	25,6	0,0376	0,0640	0,14	0,25
B. Muskeln belastet . .	25,2	0,0363	0,0631	0,14	0,25
III.					
A. Muskeln unbelastet .	25,2	0,0562	0,0452	0,22	0,17
B. Muskeln belastet . .	25,0	0,0558	0,0421	0,22	0,16
IV.					
A. Muskeln unbelastet .	25,8	0,0770	0,0588	0,29	0,22
B. Muskeln belastet . .	25,9	0,0763	0,0543	0,29	0,20

Auf Wunsch von Dr. Lothar Meyer, der durch diese Versuche die Frage nach der Beziehung des Gehaltes an Kreatin und Kreatinin zur Arbeit der Muskeln nicht erledigt hielt, unterzog ich diese Frage einer nähern Prüfung, und so entstand die vorliegende Arbeit.

Vor Allem wandte ich der Methode der Kreatinbestimmung meine Aufmerksamkeit zu. Es standen mir zwei Wege offen. Ich konnte das Kreatin entweder direct bestimmen, wie Neubauer gethan, oder nach Sarokow (Virchow's Archiv Bd. 28. Seite 544) durch Einwirkung von Säuren dasselbe in Kreatinin überführen und aus der Chlorzinkverbindung dieses Körpers das Kreatin berechnen *). Ich habe beide Methoden geprüft und gebe im Folgenden die Resultate dieser Prüfung.

Ich beginne mit einer kurzen Darlegung der Methode, die sich mir als die genaueste und bequemste erwiesen hat. Sie ist im Wesent-

*) Bezüglich der Literatur dieses Gegenstandes kann ich auf die vortreffliche Arbeit von Neubauer verweisen, diese Zeitschrift 1863. S. 22.

lichen combinirt aus denen von Städeler und Neubauer. Ich werde daran einige Bemerkungen knüpfen, die, wie ich glaube, von einigem Interesse sein dürften.

I. Beschreibung der Methode.

Ich habe meistens Froschmuskeln, z. Th. auch solche von Kaninchen und Hunden analysirt. 15—30 Grm. Muskelsubstanz, die man einem eben getödteten Thiere entnahm, wurden sorgfältig von der anhängenden Lymphe und Blutflüssigkeit mit einem Tuche befreit, rasch in ein vorher abgewogenes mit 95procentigem Alkohol gefülltes und wohl verschliessbares Kölbchen gebracht und sofort gewogen. Nun erwärmte man schwach das Kölbchen und liess die Muskeln 12—24 Stunden im Alkohol stehen. Dadurch werden dieselben hart und lassen sich um so leichter zerkleinern. Der Alkohol wurde nun abgegossen und die Muskeln mit einer Scheere klein geschnitten und mit reinem Sande fein zerrieben. Man giesst beinahe kochendes Wasser darauf und lässt die Muskeln höchstens einige Minuten (3—5 Minuten) unter fortwährendem Umrühren auf dem Wasserbade stehen. Es ist zweckmässiger recht heisses Wasser zu nehmen und mehrmals die bereits ausgepressten Muskeln mit Wasser auszuziehen, als dieselben längere Zeit (1/4—1/2 Stunde) auf dem Wasserbade zu digeriren. Denn besonders bei letzterem Verfahren kommt es gar leicht zur Bildung von Leim, der die nachträglichen Operationen wesentlich stört. Nach jedem Digeriren werden die Muskeln in einem Leinwandläppchen auf einem Trichter ausgepresst, was, wie auch Neubauer angibt, ohne Presse mit der Hand geschehen kann. Diess wiederholt man mehrmals, indem man die trockene Masse vom Läppchen herabnimmt, mit einem Glasstabe zerkleinert und wie vorher mit heissem Wasser behandelt. Drei- bis fünfmaliges Aufgiessen von Wasser genügt zur vollständigen Ausziehung von Kreatin.

Den Alkohol, in dem die Muskeln erhärtet worden, vereinigt man mit dem wässerigen Auszuge und lässt die Flüssigkeit auf schwach erwärmtem Wasserbade so lange stehen, bis der Alkohol abgedunstet ist. Alsdann filtrirt man durch sehr lockeres Papier. Sehr geeignet ist solches, das, aus Wolle dargestellt, zum Filtriren des Kaffees in den Handel kommt. Das vollständig erkaltete Filtrat versetzt man mit möglichst wenig Bleiessig, der grade hinreicht, um die Phosphorsäure, Schwefelsäure und die in Lösung übergegangenen Albuminate auszufällen. Wie auch Neubauer mit Recht betont, ist jeglicher

Ueberschuss von Bleiessig zu vermeiden, wenn man richtige Resultate erlangen will. Sobald man eine zur Ausfällung obengenannter Substanzen grade hinreichende Menge von Bleiessig hinzugefügt hat, setzt sich der Niederschlag schnell ab und die vorher opalisirende Flüssigkeit wird durchsichtig und klar. Da der flockige, zusammenballende Niederschlag gar leicht die Filterporen verstopft, so muss man den grössten Theil der Flüssigkeit durch Decantiren zu trennen suchen; dabei fand ich es zweckentsprechend, in ein gewöhnliches Filtrum ein anderes von oben erwähntem Kaffeepapier einzulegen, das nur die gröbern Theile zurückhielt und nicht so leicht verstopft wurde. Durch vorsichtiges Manipuliren trennt man leicht die Flüssigkeit vom Niederschlage, wäscht denselben mit Wasser aus, und, falls er sich fest an die Filterwände angelegt, lockert man ihn vorsichtig mit einem Glasstäbchen auf. Diese Operation muss möglichst schnell vorgenommen werden, da der Bleiniederschlag (resp. Bleialbuminat) sich leicht (wahrscheinlich in Folge der Bildung von kohlensaurem Blei) an der Luft zersetzt und die Flüssigkeit (die wieder eiweisshaltig wird) nun trübe durchs Filter geht.

Das nun erhaltene wasserklare Filtrat wird von dem wenigen überschüssigen Blei durch Schwefelwasserstoff befreit. Man filtrirt das Schwefelblei, nachdem es sich abgesetzt, ab, und dunstet die Flüssigkeit bei recht niedriger Temperatur ein. Man muss sich nicht verdriessen lassen, die Temperatur des Wasserbades fortwährend zu reguliren, und die recht flache Schale mit der Flüssigkeit recht oft umzuschwenken, um die Bildung trockener Ringe zu verhüten. Zweckmässig bedeckt man das Wasserbad fast ganz mit Ringen, so dass nur der mittlere Theil der untern Schalenfläche in geringem Umfange der unmittelbaren Einwirkung des Wasserdampfes ausgesetzt wird. Mit Geduld und Vorsicht lässt sich die Flüssigkeit ohne bemerkbare Gelbfärbung (in günstigen Fällen bleibt dieselbe ganz farblos), auf etwa 2 CC. reduciren. Man stellt dieselbe auf 2—3 Tage zur Krystallisation hin. Die ausgeschiedenen Krystalle trennt man vorsichtig von der Mutterlauge, und sammelt dieselben auf einem gewogenen Filterchen. Wenn die Lauge zu dick ist (was bei richtiger Operation selten vorkommt) oder wenn dieselbe beim Stehen fast ganz eingedunstet ist und sich schwer von den Kryställchen trennen lässt, so kann man dieselbe mit einigen Tropfen 50procentigem Weingeist verdünnen. Man lässt zuerst die Mutterlauge vollständig ablaufen ehe man zu waschen beginnt. Zum Waschen wendet man zuerst etwa 80procentigen, schliesslich absoluten Alkohol an. Die Krystalle werden dann mit dem Filter bei

100° C. getrocknet und zwischen zwei Uhrgläschen gewogen. Sämmtliche Angaben in meiner Schrift beziehen sich auf das entwässerte, bei 100° C. getrocknete Kreatin. Sehr oft wurde die Wägung nach wiederholtem Trocknen zum zweiten Male vorgenommen, um sich gegen die Fehler der unvollständigen Entwässerung zu schützen.

Zur Prüfung der Zuverlässigkeit dieser Methode wurden die entsprechenden Muskeln der linken und rechten untern Extremität von je 5—8 Fröschen, und ebenso die von einem Hunde und einem Kaninchen verwandt.

Tab. I. enthält die Resultate dieser Analysen.

Tabelle I.

	Gewicht der Muskeln in Grammen.	Gewicht des Kreatins in Grammen.	Kreatin in %.	Differenz.
I. Frosch links . .	28,6	0,0607	0,2122	0,0089
rechts . .	28,4	0,0628	0,2211	
II. Frosch links . .	30,21	0,1151	0,3810	0,0073
rechts . .	30,335	0,1178	0,3883	
III. Frosch *) links .	18,69	0,0513	0,274	0,022
rechts . .	18,71	0,0556	0,296	
IV. Hund links . . .	115	0,1900	0,1653	0,0111
rechts . .	119	0,2100	0,1764	
V. Kaninchen links .	47,1	0,185	0,393	0,021
rechts .	42,2	0,175	0,414	

Zahlreiche andere, weiter unten mitzutheilende Versuche, die zunächst zu einem andern Zwecke angestellt wurden, gewähren ebenfalls die Möglichkeit, die Maximalwerthe der möglichen Fehler, die man bei Anwendung dieser Methode begehen kann, zu bestimmen.

Im Mittel betragen die Schwankungen im Gewichte des Kreatins höchstens 0,010—0,020% vom Gewichte der analysirten Muskeln und

*) Diese Froschmuskeln hatten 2 Monate in Alkohol gelegen.

etwa 2—7% vom Gewichte des gefundenen Kreatins. Da die Kreatinmengen zwischen 0,2 und 0,4% und die Fehlergrenzen zwischen 0,01—0,02% schwanken, somit im äussersten Falle die Fehler $^1/_{10}$ der ganzen Kreatinmenge betragen können, so ist von vorne herein sowohl die grösste Sorgfalt im Operiren, als auch Vorsicht im Ziehen der Schlüsse aus den Versuchen nothwendig.

Das Filtrat von den Kreatinkrystallen habe ich zur Prüfung auf Kreatinin, resp. Bestimmung desselben verwandt. Zu diesem Zwecke wurde es mit etwa dem doppelten Vol. 95procentigen Alkohols versetzt und bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Die nach dem Zusatze von Alkohol milchig gewordene Flüssigkeit setzte nach 18—24 Stunden einen meistens am Boden und den Wänden haftenden weissen Niederschlag ab, von dem sie leicht durch Filtration zu trennen war. Die Zusammensetzung dieses Niederschlages konnte ich wegen der geringen Menge desselben nicht genauer ermitteln; er verhielt sich im Allgemeinen wie eine Eiweisssubstanz. Das klare Filtrat wurde mit 5—6 Tropfen concentrirter alkoholischer Chlorzinklösung versetzt. Nach 3—4 Tagen sammelte man die ausgeschiedenen Chlorzinkkreatininkrystalle (deren Habitus stets mikroskopisch geprüft wurde) auf einem gewogenen Filterchen, wusch dieselben zuerst mit 70—75procentigem dann mit absolutem Alkohol bis das Filtrat nicht mehr auf Chlor reagirte, in bekannter Weise aus, trocknete dieselben bei 100° C. und bestimmte ihr Gewicht.

II. Prüfung der Methode.

Bei meinen ersten Versuchen nach einem etwas anderen Verfahren fand ich bald neben Kreatin auch Kreatinin in der Muskelsubstanz, bald fand ich es nicht. Dass hierbei künstliche Bildung der einen Substanz aus der andern mit im Spiele war, lehrten mich vorzüglich solche Versuche, bei denen ich aus ganz gleich behandelten entsprechenden Muskeln der linken und rechten Extremität variable Mengen von Kreatin und Kreatinin erhielt, die sich so zu einander verhielten, dass wo weniger Kreatin gefunden wurde, stets mehr Kreatinin auftrat, und umgekehrt, die Menge beider Substanzen aber, wenn die eine auf die andere umgerechnet wurde, in beiden Muskelportionen gleich erschien. Als Beispiel führe ich die Versuche der Tab. II. an. Sie wurden an gereizten Muskeln, von denen die einen während der Contraction mechanische Arbeit verrichtet hatten, angestellt. Dass trotzdem solche Muskeln in dieser Hinsicht vergleichbar sind, wird das Weitere lehren.

Tabelle II.

	Gewicht der Muskeln.	Kreatin in Grm.	Chlorzink-kreatinin in Grm.	Kreatin in %.	Chlorzink-kreatinin in %.	Beides als Kreatin berechnet in %.	% Differenz.
I. Unbelastet	28,1	0,0510	0,0597	0,1815	0,2125	0,3353	0,0033
Belastet	28,6	0,0572	0,0536	0,2030	0,1874	0,3386	
II. Unbelastet	28,6	0,0509	0,0635	0,1780	0,2220	0,3380	0,0080
Belastet	28,3	0,0627	0,0460	0,2216	0,1625	0.3300	

Weitere Erfahrungen führten mich zur Bestätigung der Neubauer'schen Angabe, dass Kreatin bei längerer Digestion in der Wärme sehr leicht in Kreatinin übergehe. Ich fand, dass zwei- bis dreimaliges Abdampfen bis zur Trockne einer reinen Kreatinlösung auf dem Wasserbade genüge, um beträchtliche Mengen von Kreatinin zu erhalten, ferner sah ich, dass selbst äusserst geringe Mengen von Essigsäure den Uebergang des Kreatins in Kreatinin beim Abdampfen sehr befördern. Ich löste einmal 0,0529 Grm. reines Kreatin in ungefähr derselben Menge Wasser auf, als ich Flüssigkeit nach Behandlung mit Schwefelwasserstoff in meinen Versuchen gewöhnlich erhielt, fügte 5 Tropfen Essigsäure, ungefähr 25 Proc. Hydrat enthaltend, hinzu, und dampfte in gewohnter Weise ab. Es krystallisirten nur 0,0231 Grm. Kreatin aus der concentrirten Lauge aus; das Filtrat gab mit Chlorzink eine massenhafte Krystallisation, über deren Natur selbst das blosse Auge kaum im Zweifel sein konnte. Deshalb änderte ich mein ursprüngliches Verfahren, bei welchem ich vor dem Versetzen mit Bleiessig aus dem mit Essigsäure schwach angesäuerten Muskelauszuge das Eiweiss durch Coagulation in der Hitze zu entfernen pflegte. Dass auch die aus überschüssig zugesetztem Bleiessig herrührende Essigsäure bei der Analyse störend wirken, resp. die Bildung beträchtlicher Mengen von Kreatinin veranlassen muss, ist darnach leicht ersichtlich.

Dieser leichte Uebergang von Kreatin in Kreatinin selbst bei verhältnissmässig niedrigen Temperaturen, veranlasste mich auch die oben beschriebene Methode noch näher darauf zu prüfen, ob sie nicht die Bildung von Kreatinin bedinge. Ich setzte zu einem von zwei ganz gleichen Muskelauszügen eine abgewogene Menge reinen Kreatins hinzu, und war gewärtig, falls die Methode anwendbar sein sollte, die ganze

Menge Kreatins, sowohl die in der Muskelflüssigkeit ursprünglich vorhandene, als auch die zugesetzte, unzersetzt wieder zu erhalten. Die mit Froschmuskeln angestellten Versuche entsprachen vollkommen meiner Erwartung, wie die Tabelle III. lehrt. Die Differenz zwischen dem der einen Portion zugesetzten und dem gefundenen Kreatin war stets sehr annähernd gleich der in der anderen Portion gefundenen Menge.

Tabelle III.

	Muskelgew. Grm.	Kreatingew. Grm.	Kreatin %.	% Differenz.
I. Links . . .	21,11	0,1189		
Zugesetzt . .	—	0,0452		
Diff. . . .	—	0,0737	0,3491	0,0014
Rechts . . .	21,45	0,0746	0,3477	
II. Links . . .	28,38	0,0874	0,3080	
Rechts . . .	27,73	0,1464		
Zugesetzt . .	—	0,0575		0,0126
Diff. . . .	—	0,0889	0,3206	
III. Links . . .	22,66	0,0530	0,2334	
Rechts . . .	22,77	0,0686		0,0129
Zugesetzt . .	—	0,0184		
Diff. . . .	—	0,0502	0,2205	
IV. Links . . .	17,37	0,0730		
Zugesetzt . .	—	0,0314		
Diff. . . .	—	0,0416	0,2399	0,0132
Rechts . . .	16,76	0,0380	0,2267	

Es wird also bei dem Verfahren nach der angegebenen Methode die zugesetzte Quantität Kreatin unverändert wieder erhalten.

Ich lasse hier noch einen Versuch folgen, in dem ich zu der einen Portion eine abgewogene Menge reinen Kreatinins hinzufügte.

	Muskelgew. Grm.	Kreatingew. Grm.	Kreatin in %	% Differenz.
A. Links . .	15,51	0,0529	0,3410	0,0101
B. Rechts . .	15,17	0,0502	0,3309	

Zu B waren 0,0770 Grm. Kreatinin hinzugefügt worden. Man erhielt in oben erwähnter Weise 0,1169 Grm. Chlorzinkkreatinin = 0,0730 Grm. Kreatinin. Der Verlust einer kleinen Menge Chlorzinkverbindung, die zur mikroskopischen Prüfung herausgenommen wurde, hat jedenfalls etwas zur Entstehung dieser Differenz beigetragen. Dass das hierzu angewandte Kreatinin hinlänglich rein war, beweist folgende Angabe. 0,0358 Grm. desselben Kreatinins gaben 0,0578 Grm. Chlorzinkkreatinin = 0,0361 Grm. Kreatinin. Da beim angegebenen Verfahren der Uebergang des Kreatinins in Kreatin von vornherein unwahrscheinlich war, so hielt ich es für überflüssig, dergleichen Versuche zu mehren.

Trotz zahlreicher auf oben beschriebene Weise angestellter Versuche konnte ich kein Kreatinin weder aus ruhenden noch aus gereizten Muskeln erhalten. Unter den neueren Forschern fand Sarokow namentlich in gereizten Muskeln Kreatinin in beträchtlicher Menge, Borszczow betrachtet sogar Kreatinin als den einzigen normalen Bestandtheil der Muskelflüssigkeit (Würzburger Zeit. II. 1861 pag. 65). Da die Angaben Sarokow's vielfach Anerkennung gefunden, obschon Neubauer bereits die Anwesenheit des Kreatinins in den Muskeln sehr unwahrscheinlich gemacht hat, so hielt ich es um so mehr für meine Pflicht, noch auf andere Weise dem mir vielleicht entschlüpfenden Kreatinin nachzuspüren. — Zu dem Zwecke zog ich fein zerriebene Muskeln zwei- bis dreimal mit kochendem Alkohol von 95% aus, dunstete das Filtrat unter Zusatz von etwas Wasser bei recht niederer Temperatur ein, trennte so gut es ging das ausgeschiedene Fett und andere etwaige Unreinigkeiten durch Filtration ab, und stellte die übriggebliebene geringe Menge von Flüssigkeit zur Krystallisation hin. Den andern oder den dritten Tag erhielt ich wohl Krystalle, die sich aber als Kreatin erwiesen. Die Mutterlauge prüfte ich in bekannter Weise auf Kreatinin, erhielt jedoch selbst nach langem Warten nie die charakteristische Chlorzinkverbindung.

Der Rückstand von dem alkoholischen Auszuge wurde noch nac

träglich mit Wasser ausgezogen und in gewöhnlicher Weise behandelt. Ich erhielt aus demselben gar keine krystallinische Substanz zum Beweise, dass bereits der Alkohol die ganze Kreatinmenge ausgezogen hatte.

So einfach und einladend diese Methode, welche die Anwendung jeglicher Reagentien ausschliesst, auch erscheint, so lässt sie sich zur quantitativen Bestimmung des Kreatins doch nicht empfehlen, besonders weil man das Kreatin nur sehr ungenau und schwierig ganz von Fett befreien kann. Nach dem Abdunsten des Alkohols bleibt nämlich dasselbe in Emulsion in der wässerigen Lösung, und lässt sich daraus nicht durch Schütteln selbst mit grossen Mengen Aethers abscheiden; beim Abdampfen dagegen scheidet sich dasselbe an den Wandungen des Schälchens ab. Einmal versuchte ich dasselbe durch wiederholte Filtration abzuscheiden, und wusch schliesslich die ausgeschiedenen Krystalle mit Alkohol und Aether aus. Es möge mir erlaubt sein, wenigstens einen Versuch (No. I.), in welchem ich in dieser einfachen Weise das Kreatin quantitativ bestimmte, anzuführen. Ich reihe daran zwei andere ihm entsprechende Versuche; in No. II. ist die Analyse nach meiner oben beschriebenen Methode ausgeführt; bei No. III. schlug ich das ursprüngliche Liebig'sche Verfahren mit unwesentlicher Modification ein. Die Muskeln (bei III.) wurden in gewohnter Weise in Alkohol abgewogen und mit warmem Wasser extrahirt. Nach Abdunsten des Alkohols schlug man das Albumin mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure nieder, dann wurde Schwefel- und Phosphorsäure mit Barytwasser weggenommen und der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt. Der Theil des Baryts, der als doppeltkohlensaures Salz in Lösung zurückgeblieben war, schied sich allmählich beim Abdunsten ab und wurde durch Filtration entfernt. Die eingeengte Flüssigkeit stellte man schliesslich zur Krystallisation hin. — Alle drei Versuche betreffen gereizte Muskeln. Die Frösche waren sechs Stunden hindurch mittelst das Rückenmark in Intervallen von 30 Sec. treffender Inductionsschläge in bekannter Weise tetanisirt worden. Die Resultate enthält Tabelle IV.

Tabelle IV.

	Muskelgew. in Grm.	Kreatin in Grm.	Kreatin in %.
I.	16,66	0,0542	0,3253
II.	23,31	0,0848	0,3638
III.	22,86	0,0738	0,3228

In diesen drei Versuchen, zu denen jedesmal recht kräftige Frösche dienten, erhielt ich demnach bei Anwendung verschiedener Methoden nahezu gleiche Mengen Kreatin, deren Unterschiede nicht grösser sind, als die möglicherweise durch die individuelle Verschiedenheit der Thiere bewirkten. Ich suchte jedoch in allen drei Analysen vergebens nach Kreatinin.

Da Sarokow den Muskelauszug mehrmals bei 100° C. auf dem Wasserbade bis zur Trockne abdampfte, musste er, wie aus dem früher Gesagten erhellt, nothwendig beträchtliche Mengen Kreatinin erhalten. Ich meinerseits schliesse mich der Ansicht Neubauer's an, und glaube mit Sicherheit dargethan zu haben, dass Kreatinin weder in ruhenden noch in gereizten Muskeln ursprünglich sich vorfindet, das aus denselben erhaltene vielmehr stets ein Kunstproduct der Analyse gewesen ist.

III. Bestimmung des Kreatins als Kreatinin.

Nachdem die Abwesenheit des Kreatinin's bewiesen, handelt es sich nun bei diesen Bestimmungen nur um eine Substanz, nämlich das Kreatin. Da dieser Stoff sich leicht in Kreatinin überführen und als solches durch Chlorzink ausscheiden lässt, versuchte ich nach Sarokow's Vorgang auch auf diese Weise das Kreatin zu bestimmen, und operirte folgendermaassen: Der in gewohnter Weise erhaltene wässerige Auszug wurde nach dem Abdunsten des Alkohols mit einigen Tropfen sehr verdünnter Schwefelsäure behufs der Eiweissentfernung versetzt; nachher mit 3 — 5 CC. verdünnter Schwefelsäure (1. Vol. Schwefelsäurehydrat auf 19 Vol. Wasser) 6—8 Stunden gekocht, das gebildete schwefelsaure Kreatinin in der Wärme mit kohlensaurem Baryt zersetzt; das erhaltene Filtrat mit etwas Essigsäure angesäuert, bis auf eine geringe Quantität eingeengt, noch warm mit dem mehrfachen Volumen Alkohols vermischt, nach einigen Stunden abfiltrirt und mit alkoholischer Chlorzinklösung versetzt. Ich wandte hierzu die Muskeln der einen untern Extremität an; die entsprechenden Muskeln der andern Extremität wurden in der oben beschriebenen Weise analysirt. Die Versuche I. und II. der Tabelle V. wurden in dieser Weise angestellt. — Da ich aus dem Frühern wusste, wie leicht schon Essigsäure Kreatin in Kreatinin überführe, so versuchte ich in III. der Tabelle V. diese Säure statt der Schwefelsäure anzuwenden. Der Muskelauszug wurde mit Essigsäure angesäuert, das Eiweiss durch Coagulation in der Wärme entfernt, das Filtrat mit etwa 2 CC. Essig-

säure von 25 p. C. 6 Stunden gekocht, eingeengt, noch warm mit Alkohol vermischt und in bekannter Weise weiter behandelt.

Die letzte Colamne der Tabelle V. zeigt den nach beiden Methoden für den Procentgehalt an Kreatin gefundenen Werth. Die directe Bestimmung hat stets erheblich grössere Mengen ergeben als die Berechnung aus dem gefundenen Chlorzinkkreatinin.

Tabelle V.

	Muskelgew. in Grm.	Chlorzinkkreatinin in Grm.	Chlorzinkkreatinin in %.	Kreatin in Grm.	Kreatin in %.
I. Hund.					
Rechts .	15,60	0,0349	0,2238	—	0,1619
Links . .	16,31	—	—	0,0355	0,2190
II. Kaninchen.					
Rechts .	20,71	0.0485	0,2342	—	0,1640
Links . .	18,55	—	—	0,0792	0,4270
III. Frosch.					
Rechts .	18,19	0,0422	0,2320	—	0,1680
Links . .	18,72	—	—	0,0582	0,3109

Ich muss bemerken, dass in den drei Versuchen der Tabelle V., ebenso wie bei denen Sarokow's, der erste Tropfen Chlorzinklösung zu einem flockigen Niederschlage Veranlassung gab, von dem erst abfiltrirt werden musste, ehe man mehr Chlorzink zusetzte und die Lösung zur Krystallisation hinstellte. Denselben flockigen Niederschlag nach dem Zusatze von Chlorzink habe ich schon früher einigemal bemerkt, als ich in gewöhnlicher Weise operirte. Er traf nur dann ein, wenn ich einen zu grossen Ueberschuss von Bleiessig angewandt oder die Temperatur nicht gehörig geregelt hatte. In diesen Fällen hatte die Flüssigkeit stets eine deutliche Gelbfärbung angenommen. Das Verhalten besagten Niederschlages war wie es Sarokow beschrieben hat; es liess auf eine Eiweisssubstanz schliessen. Mitunter erschien dieser Niederschlag in einer Form, die täuschend die sogenannten Faserstoffcylinder im pathologischen Harne nachahmte.

Dass sein Auftreten die Bestimmung des Kreatinin's wesentlich stört, versteht sich von selbst; deshalb habe ich dergleichen Versuche, deren ich noch mehrere ausgeführt, als mit unberechenbaren Fehlern behaftet, nicht weiter berücksichtigt. Ob die Substanz, welche diesen Niederschlag erzeugt, die einzige Ursache ist, dass hier der grösste Theil des Kreatins der Bestimmung entging; ob letzteres weiter zersetzt worden, und was etwa aus demselben entstanden sein kann, vermag ich nicht näher anzugeben. Da es sich mir nicht um Vermehrung der Methoden der Kreatinbestimmung handelte, so verfolgte ich die Sache nicht weiter.

Die von mir angewandte, oben mitgetheilte Methode der quantitativen Kreatinbestimmung scheint mir allen billigen Anforderungen zu entsprechen und ist jedenfalls als die genaueste und bequemste unter den bis jetzt vorgeschlagenen anzusehen. — Dass ich nach derselben Methode mehr Kreatin, als nach andern aus demselben Muskel erhalten habe, kann nur zu ihren Gunsten sprechen. Im Allgemeinen fand ich nach derselben einen höheren Kreatingehalt der Muskeln, als frühere Forscher angeben. — Es lässt sich zwar nicht verschweigen, dass die Bestimmung einer Substanz durch langsames Auskrystallisiren statt durch Fällung einen constanten Fehler involviren muss; immerhin aber ist die Methode in Ermangelung einer bessern, falls sie nur mit Vorsicht und unter Vermeidung der angegebenen Fehlerquellen gehandhabt wird, wohl geeignet zur Lösung mancher physiologischen Fragen. — Einige Resultate, welche ich mittelst derselben erhalten habe, bilden den vierten Theil dieser Abhandlung.

Will man diese Methode zur Darstellung grösserer Mengen von Kreatin aus den Muskeln anwenden, so darf man nur die bereits ziemlich eingeengte Flüssigkeit, ehe sie eine deutliche Gelbfärbung zeigt, auf einen Teller oder ein anderes ganz flaches Gefäss mit sehr breitem Boden (die flachen Porzellangefässe, die von den Photographen benutzt werden, sind hierzu sehr geeignet) aussgiessen und dasselbe an einen mässig warmen Ort stellen. Nach 2—4 Tagen erhält man bereits in der Wärme oder beim Hinausstellen in kalte Luft eine massenhafte Krystallisation von Kreatin, die auf einem Filter nach dem Ablaufen der Lauge zwei- bis dreimal mit starkem Spiritus gewaschen ein ganz reines Präparat gibt. Zur Darstellung von Kreatin in grösserer Menge möchte ich vor Allem die Muskeln magerer Kaninchen anempfehlen.

IV. Anwendungen der Methode.

Seit Liebig angegeben, dass die Muskeln zu Tode gehetzter Thiere verhältnissmässig sehr viel Kreatin enthalten, seitdem andere Forscher diesen Stoff im Herzmuskel, dem Muskel, der fortwährend arbeitet, in relativ grossen Mengen vorgefunden haben, fand die Idee Anklang: „Kreatin werde besonders während der Muskelarbeit gebildet." Sarokow hat scheinbar die Vermehrung des Kreatins bei gereizten Muskeln direct nachgewiesen, und J. Ranke (Tetanus 1865 S. 10, 200 &c.) stellt dieses als ein wichtiges Ergebniss der neuern Forschungen hin. — Da ich nach meiner Methode zu entgegengesetzten Resultaten gekommen bin, so erlaube ich mir dieselben hier kurz anzuführen. Die Frage, ob das Kreatin während der Muskelarbeit zunehme, lässt sich nicht dadurch lösen, dass man den Kreatingehalt der Muskeln eines Individuums mit dem eines andern vergleicht, wie Sarokow gethan hat. Vielfache Kreatinbestimmungen haben mir erwiesen, dass der Kreatingehalt selbst von entsprechenden Muskeln der Thiere derselben Species, die scheinbar unter denselben Bedingungen lebten, grossen Schwankungen unterliege. Froschmuskeln enthalten 0,2 — 0,4 Grm. Kreatin auf 100 Grm. frischer Muskelsubstanz. — Deshalb verglich ich in meinen Versuchen die gleichnamigen Muskeln der einen untern Extremität mit denen der andern bei einem und demselben Thiere. Dass diese Vergleichung richtige Resultate ergeben muss, wird man leicht aus den bereits mitgetheilten Analysen einsehen.

1. Vergleichung ruhender Muskeln mit durch elektrische Reizung ermüdeten.

Um den Blutkreislauf zu eliminiren, entfernte ich bei 6 Fröschen die Brust- und Baucheingeweide. Die Muskeln der einen Extremität wurden bis zur Ermüdung vom Rückenmark aus gereizt; die andere Extremität, die ich beim Beginne des Versuches vom Rumpfe getrennt hatte, wurde unter sonst denselben Bedingungen ruhend in einem feuchten Raume aufbewahrt. Die gleichnamigen Muskeln beider Seiten wurden zugleich ausgeschnitten und analysirt. Die Resultate enthält Tab. VI

Tabelle VI.

	Muskelgew. in Grm	Kreatin in Grm.	Kreatin in %.	Differenz in %.
I.				
Rechts, ruhend .	25,56	0,0574	0,2245	— 0,0204
Links, gereizt .	25,08	0,0512	0,2041	
II.				
Links, ruhend .	23,97	0,0775	0,3233	+ 0,0263
Rechts, gereizt .	24,80	0,0866	0,3496	
III.				
Rechts, ruhend .	21,71	0,0634	0,2923	— 0,0011
Links, gereizt .	21,91	0,0638	0,2912	
IV.				
Links, ruhend .	16,44	0,0566	0,3443	— 0,0045
Rechts, gereizt .	16,75	0,0569	0,3398	

2. Vergleichung gereizter Muskeln mit solchen, die überdiess eine mechanische Arbeit geleistet haben.

Sechs kräftige Frösche wurden an der Nase an einer galgenartigen Vorrichtung aufgehängt. Damit die Contractionen recht ergiebig ausfallen konnten, wurde die Achillessehne vom Knochen abgetrennt, und das Femur möglichst ohne Blutverlust durchgeschnitten. An die Achillessehne des einen Beines wurden 100 Grm. gehängt und nun die sonst unversehrten Frösche möglichst lange vom Rückenmark aus tetanisirt. Vor dem Tode der Thiere wurden die Muskeln in oben erwähnter Weise ausgeschnitten und zugleich analysirt. Tabelle VII. führt uns die Ergebnisse der Versuche vor. — Die Versuche der Tabelle II., Seite 336, gehören auch hierher.

Tabelle VII.

	Muskelgew. in Grm.	Kreatin in Grm.	Kreatin in %.	Differenz in %.
I.				
Unbelastet . .	36,9	0,0940	0,255	0,009
Belastet . . .	35,7	0,0943	0,264	
II.				
Unbelastet . .	25,4	0,0438	0,1724	0,0195
Belastet . . .	25,9	0,0497	0,1919	
III.				
Unbelastet, rechts	26,02	0,0849	0,3262	0,0054
Belastet, links .	25,98	0,0833	0,3208	
IV.				
Unbelastet, links	17,38	0,0627	0,3601	0,0087.
Belastet, rechts .	17,19	0,0634	0,3688	

3. Kreatinbestimmung der Muskeln mit Curare vergifteter Thiere, bei denen möglichst lange eine künstliche Respiration unterhalten wurde.

Wenn die Kreatinbildung in den Muskeln wesentlich durch die Bewegung befördert würde, so müsste dieselbe Substanz in solchen Muskeln, die längere Zeit in vollständiger Ruhe verharren, während das Blut circulirt, in relativ geringer Menge vorkommen. Das Blut, das fortwährend seine Bestandtheile mit denen der Gewebe austauscht, dürfte wohl einen wesentlichen Theil des Kreatins allmählich durch Diffusion aufnehmen und auf den gewöhnlichen Wegen ausscheiden.

Die erforderte Bewegungslosigkeit der Muskeln, während der ungestörten Fortdauer anderer Lebensfunctionen, wurde bei Hunden und

Kaninchen durch Vergiften mit kleinen Dosen Curare, das bekanntlich die Muskelthätigkeit lähmt, herbeigeführt. Damit nicht durch die Lähmung der Athmungsmusculatur Erstickung einträte, musste während des Versuches künstliche Respiration unterhalten werden. Man suchte diesen Zustand möglichst lange zu erhalten (bei I. und II. 8 Stunden, bei III. 6 Stunden), indem man dem Thiere von neuem etwas Curare subcutan injicirte, sobald spontane Bewegungen sich einzustellen begannen. Ich führe in der Tabelle VIII. die Resultate dreier Versuche an.

Tabelle VIII.

	Muskelgew. in Grm.	Kreatin in Grm.	Kreatin in %.
I. Hund.			
Muskeln rechts .	16,77	0,0530	0,3160
Muskeln links .	16,50	0,0502	0,3042
II. Hund.			
Muskeln links .	16,31	0,0355	0,2190
III. Kaninchen.			
Muskeln links .	18,55	0,0792	0,4270

Beim gesunden Hunde unter normalen Verhältnissen fanden wir 0,16 — 0,17 % Kreatin, beim Kaninchen 0,39 — 0,41 % Kreatin. Wir glauben hieraus schliessen zu können, dass keine Abnahme des Kreatins in den Muskeln selbst bei vollständiger Ruhe stattfinde.

4. Vergleichung von Muskeln der hintern Extremität eines Hundes mit dem Herzmuskel desselben Thieres.

Ich analysirte bei Hunden zugleich die Muskeln der untern Extremität und die des Herzens. Möge es erlaubt sein, zwei dergleichen Resultate in der Tabelle IX. vorzuführen. No. I. bezieht sich auf einen Hund unter normalen Verhältnissen; No. II. auf einen, der vermittelst Curare während 8 Stunden bewegungslos geblieben war. Hier müsste der etwaige Unterschied recht deutlich hervortreten, da das Herz durch Curare nicht bewegungslos wird und hier ungestört pulsirte, während die andern Muskeln 8 volle Stunden in vollständiger Ruhe verharrten.

Tabelle IX.

	Muskelgew. in Grm.	Kreatin in Grm.	Kreatin in %.	Differenz geg. d. Herz. %.
I. Gesunder Hund *)				
Linke hint. Extrem.	115	0,1900	0,1653	+ 0,0098
Rechts hint. Extr.	119	0,2100	0,1764	— 0,0013
Herz	25,7	0,0450	0,1751	
II. Mit Curare vergifteter Hund **).				
Linke hint. Extrem.	16,31	0,0355	0,2190	— 0,0063.
Herz	32,54	0,0692	0,2127	

Alle diese Versuche zeigen uns deutlich, dass in den Muskeln während der Arbeit keine irgend erhebliche Vermehrung des Kreatins stattfinde.

Es ist möglich, dass es durch Auffinden schärferer analytischer Methoden in Zukunft gelingen wird, einen Einfluss der Thätigkeit der Muskeln auf ihren Kreatingehalt nachzuweisen. Jedenfalls aber ist dieser Einfluss nur ein untergeordneter und so gering, dass er von den Fehlergrenzen der von mir angewandten Methode, die unter den bisherigen zoochemischen jedenfalls zu den schärferen gehört, vollständig verdeckt wird.

Ist, wie allgemein angenommen wird, das Kreatin wirklich ein aus dem Stoffwechsel der Muskeln herrührendes Zersetzungsproduct, so wird dasselbe fort und fort, und nicht etwa nur während der Thätigkeit der Muskeln gebildet. Wir müssen aber eingestehen, dass, nach den hier mitgetheilten Versuchen, unsere Kenntniss seiner Bedeutung für den Stoffwechsel der Muskeln noch unvollständiger ist, als man bisher anzunehmen gewohnt war.

*) Versuch IV. Tabelle I. Seite 334.

**) Versuch II. Tabelle VIII. a. v. S.